

PCT/KR 00/01369
RO/KR 28.11.2000.
NR00/01369

REC'D 08 JAN 2001
WIPO PCT

10/031809

대한민국 특허청

KOREAN INDUSTRIAL PROPERTY OFFICE

ETU

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제 53780 호
Application Number

출원년월일 : 1999년 11월 30일
Date of Application

출원인 : 주식회사 두산
Applicant(s)

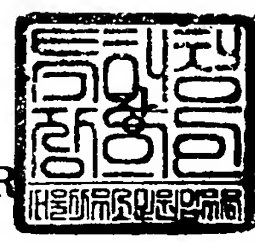
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2000 년 06 월 28 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	1999.11.30
【발명의 명칭】	리소포스파티딜에탄올아민의 제조방법
【발명의 영문명칭】	A method for preparing lysophosphatidylethanolamine
【출원인】	
【명칭】	주식회사 두산
【출원인코드】	1-1998-000923-6
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	9-1998-000307-3
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	9-1998-000434-4
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정국훈
【성명의 영문표기】	CHUNG, Guk Hoon
【주민등록번호】	620906-1011211
【우편번호】	449-840
【주소】	경기도 용인시 수지읍 상현리 99 벽산아파트 104동 104호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	양영래
【성명의 영문표기】	YANG, Young Lae
【주민등록번호】	711019-1453519
【우편번호】	440-240
【주소】	경기도 수원시 장안구 연무동 217-22 1층 1호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 윤동열 (인) 대리인 이선희 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 5 면 5,000 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 12 항 493,000 원

【합계】 527,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장_1통[추후제출]

【요약서】**【요약】**

본 발명은 인지질 혼합물을 효소 처리한 후 용매 분획함에 의해 칼럼 정제법을 거치지 않고 고순도의 리소 포스파티딜에탄올아민 (Lysophosphatidyl-ethanolamine)을 정제하는 방법을 제공한다. 이 방법에 따르면, 포스파티딜에탄올아민 (Phosphatidylethanolamine)을 10~99 중량%의 양으로 함유하는 인지질 혼합물을 포스포리파제 A2(phospholipase A2)로 가수분해시킨 후, 생성된 리소 인지질을 리소 포스파티딜에탄올아민 이외의 불순물을 제거하기 위해 저급알콜, 탄화수소 및 알킬 에스테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 유기용매와 물의 혼합물로 처리함으로써 리소 포스파티딜에탄올아민 이외의 불순물을 제거함으로써 고순도의 리소포스파티딜에탄올아민의 제조함을 특징으로 하는 방법에 관한 것이다.

【색인어】

인지질, 리소포스파티딜에탄올아민, 정제

【명세서】

【발명의 명칭】

리소포스파티딜에탄올아민의 제조방법 {A method for preparing

lysophosphatidylethanolamine}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 인지질 혼합물(phospholipid mixture)로부터 고순도의 리소포스파티딜에탄올아민을 정제하는 방법에 관한 것이다. 보다 상세히 설명하면, 인지질 혼합물을 효소 처리한 후 용매분획(solvent fractionation)함에 의해 칼럼 정제법을 거치지 않고 고순도의 리소 포스파티딜에탄올아민을 정제하는 방법에 관한 것이다.

<2> 리소포스파티딜에탄올아민(Lysophosphatidylethanolamine)은 동식물의 세포에 천연적으로 존재하며 특히 난황이나 뇌 세포에 많이 함유되어 있다. 리소포스파티딜에탄올아민은 세포막 (cell membrane) 에서 발견되는 인지질(phospholipids)의 일종인 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine)으로부터 유도된다. 난황이나 대두 레시친에 풍부한 포스파티딜에탄올아민은 인지질의 일종으로서 2개의 지방산을 분지 내에 함유하고 있다. 생체 내에서는 포스파티딜에탄올아민이 인지질 가수분해 효소인 포스포리파제 (Phospholipase) A2 작용을 받아 sn-2 위치에 있는 1개의 지방산이 제거됨에 의해 리소포스파티딜에탄올아민 (Lysophosphatidylethanolamine)으로 변환된다.

<3> 리소포스파티딜에탄올아민은 과실의 숙성(ripening)과 노화(senescence)에 매우 중요한

역할을 하는 것으로 알려져 있다. 리소포스파티딜에탄올아민의 처리는 토마토의 잎(leaves)과 과실의 노화를 억제해 주는 것으로 알려져 있으며 토마토의 수확후 처리시 과실의 저장기간을 연장시켜주는 역할도 하는 것으로 알려져 있다.(US patent 5110341, US patent 5126155) 또한 사과에 처리시 껍질에 안토시아닌(anthocyanin) 형성을 촉진하며 수확된 사과의 저장 중 연화(loss of firmness) 억제작용을 하는 것으로 알려져 있다. 이런 작용은 사과, 크랜베리(cranberry), 토마토(tomato)등 과실의 호흡속도(respiration rate)를 낮추어주는 역할과 에틸렌(ethylene) 가스 형성을 촉진하거나 억제하는 기능과 연관이 있는 것으로 알려져 있다.(Farag,K.M. and J.P. Palta, 'Stimulation of Ethylene Production by Erea, Thidiazoron, and Lysophosphatidylethanolamine and Possible sites of this stimulation' Annual meeting of the American Society of Plant Physiologists, April 1989)

- <4> 적당한 농도로 조절된 리소포스파티딜에탄올아민 용액은 절화(Cut flower)의 수명을 연장하는 수단으로 이용되기도 한다.(HortScience 32(5): 888-890, 1997) 일반적으로 당을 함유한 실버티오설페이트(Silver thiosulfate) 용액은 이 용액을 수확한 꽃에 약 20 시간이상 처리함에 의해 꽃의 노화를 억제시키기 때문에 이런 용도로 최근까지 사용되어져 왔다. 하지만 이 용액중에 함유된 은 이온(silver ion)이 환경오염을 야기시키는 문제 때문에 최근 미국에서는 사용을 꺼리고 있다. 천연에서 정제한 리소포스파티딜에탄올아민도 실버 티오설페이트 용액과 유사하게 절화의 꽃병 내 저장성을 증가시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 이와 같은 분야에서 리소포스파티딜에탄올아민의 이용이 활발히 추진되고 있다.

- <5> 현재까지 공업적으로 고순도 리소포스파티딜에탄올아민을 생산할 수 있는 방법은 개발

되어 있지 않았으며 실리카겔(Silica gel) 칼럼 크로마토그래피법을 이용한 소량 규모의 분리정제가 실험실적으로 이루어지고 있다. 이것은 Avanti Polar Lipids, Inc나 Sigma 사에 의해 시약용으로만 소량 판매되고 있고, 가격도 매우 고가이다. 더욱이, 칼럼 크로마토그래피를 이용한 리소포스파티딜에탄올아민의 생산은 리소포스파티딜콜린과 리소포스파티딜에탄올아민이 칼럼내에서 유사한 이동패턴을 보이기 때문에, 리소포스파티딜에탄올아민의 분리가 매우 어렵다고 하는 문제점을 갖는다. 또한 일반 헥산이나 에탄올과 같이 저독성인 유기용매를 단독용매로 이용하여 칼럼 크로마토그래피를 하는 경우에는 리소포스파티딜에탄올아민이 유기 용매에 매우 낮은 용해도를 갖기 때문에 정제가 매우 어려운 단점도 있다. 한편, 클로로포름, 벤젠, 메탄올과 같이 매우 독성이 심한 것으로 알려진 용매계를 이용하여 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제할 때에만 좋은 결과를 얻을 수 있으나 수율도 나쁘고 정제에 많은 비용이 든다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <6> 따라서 본 발명의 목적은 고순도의 리소포스파티딜에탄올아민을 대량으로 고수율로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <7> 본 발명은 상술한 목적을 달성하기 위하여, 포스파티딜에탄올아민이 함유되어 있는 인지질 혼합물을 포스포리파제로 처리하여 포스파티딜에탄올아민을 리소포스파티딜에탄올아민으로 전환시키고, 이어 이 리소포스파티딜에탄올아민이 함유되어 있는 리소인지질 혼합물을 특정 용매 혼합물로 처리하여 리소포스파티딜에탄올아민을 결정화하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.

◁ 본 발명은 또한 인지질 혼합물 중의 포스파티딜에탄올아민의 함량을 높이기 위하여, 인지질에 다량으로 존재하는 포스파티딜콜린을 인지질 전환효소인 포스포리파제 D로 처리하여 인지질 내의 포스파티딜에탄올아민의 함량을 높이는 단계를 더 포함하는 방법을 제공한다.

◁ 이하 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

<10> 본 발명의 방법에 사용되는 출발 물질인 인지질 혼합물은 포스파티딜에탄올아민을 10~99중량%, 바람직하게는 30~99중량%의 양으로 함유하는 것으로서, 예를 들면 대두 레시틴, 조(粗) 대두 레시틴, 난황 레시틴 등을 예시할 수 있다.

<11> 그러나, 자연계에 존재하는 인지질 혼합물중 포스파티딜에탄올아민의 함량은 대개 포스파티딜콜린함량보다 적으며 본 발명이 보다 효율적인 공정이 되도록 하기 위해 인지질내 포스파티딜에탄올아민의 함량을 높이는 것이 좋다. 즉, 대두유의 제조 공정 중에 부산물로 생산되는 조 대두 레시틴(crude soybean lecithin, 흔히 '조 레시틴'이라 함)은 60~70% 극성(極性)지질(인지질/ 당지질), 27~39%의 대두유, 1~3%의 물, 0.5~3%의 기타 성분들로 구성되어 있다. 이중 극성지질은 조 레시틴에 포함된 중성지질인 대두유를 제거함에 의해 정제될 수 있는데, 정제된 상태의 조성은 22~30% 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine, 이하 'PC'로 약칭하기도 함), 2~5% 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine, 이하 'LPC'로 약칭하기도 함), 16~22% 포스파티딜에탄올아민(이하 'PE'로 약칭하기도 함), 0.5~2% 리소포스파티딜에탄올아민(이하 'LPE'로 약칭하기도 함), 0.5~8% 포스파티딘산(Phosphatidic acid, 이하 'PA'로 약칭하기도 함), 0.1~3% 포스파티딜세린(phosphatidyl serine), 6~15% 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol), 기타 등으로 구성되어 있다. 난황 레시틴의 경우에도 73~83%

PC, 2~5% LPC, 13~17% PE, 0.1~3% LPE, 기타 등으로 구성되어 있다. 따라서 인지질 중에는 매우 소량의 리소포스파티딜에탄올아민이 함유되어 있기 때문에 이들 레시틴으로부터 직접 리소포스파티딜에탄올아민을 분리하여 상업적으로 사용하는 것은 거의 불가능하다.

<12> 그러므로, 인지질 혼합물에 다량으로 포함되어 있는 PC를 PE로 전환시킨 후, 혹은 필요에 따라 이렇게 처리된 인지질 혼합물로부터 일차적으로 포스파티딜에탄올아민을 정제하거나 혹은 농축법을 이용하여 PE의 함량을 높이는 방법 등에 의해 처리된 것을 출발물질로 사용할 수도 있다. PE의 함량을 높이기 위한 목적으로는 인지질의 용매에 대한 용해도 차이를 이용한 분획법, 칼럼 크로마토그래피 방법에 의한 분획법, 또는 인지질 전환 효소를 이용한 포스파티딜에탄올아민의 농축법등이 이용될 수 있다.

<13> 칼럼 크로마토그래피에 의한 포스파티딜에탄올아민의 농축은 주로 실리카겔이나 플로리실(Florisil)같은 흡착제 혹은 DEAE 셀룰로스, TEAE 셀룰로스 같은 이온교환수지등을 이용하여 분획, 농축하는 방법이 알려져 있다. (G. Rouser, G. Krichewsky, A. Yamamoto, 'Lipid Chromatographic Analysis' ed by G.V. Marinetti, Vol.1, p99, Dekker, New York(1967), D.J. Hanahan, J.C. Dittmer, E. Warashina, J. Biol. Chem. 228, 685 (1957)). 용해도 차이를 이용한 분획법으로서는 알콜을 이용한 분획방법(V. H. Pardon, Fette Seifen Anstrichmittel 86, 55(1984), J. Holzl and H. Wangner, Z. Naturforsch., 26b, 1151(1971)), 원심 분배크로마토그래피법 (centrifugal partition chromatography, Bio Industry 2(8) 40 1985)등이 알려져 있다.

<14> 인지질 내의 포스파티딜에탄올아민의 함량을 높이는 또다른 방법으로 효소(특히 포스포리파제 D, Phospholipase D)가 주로 이용된다. 즉 대두나 난황 인지질에 인지질전환 효

소인 포스포리파제 D와 다량의 에탄올아민을 첨가하여 반응시키면 포스파티딜전환 (transphosphatidylation) 반응에 의해 포스파티딜에탄올아민이 다량 함유된 인지질을 얻을 수 있다. [S.F. Yang, et al., J. Biol. Chem., 242(3), 477-484(1967), R.M.C.Dawson, Biochem. J., 102 205-210 (1967)]

<15> 따라서 위의 공지된 방법을 이용하여 고농도로 포스파티딜에탄올아민이 농축된 인지질 혼합물도 본 발명을 위한 원료로 사용할 수 있다.

<16> 본 발명의 한 구현예에서는, 인지질내 포스파티딜에탄올아민의 함량을 높이기 위해 인지질 전환효소인 포스포리파제 D를 이용하였는데, 이 효소는 미생물이나 식물로부터 얻어질 수 있다. 양배추(Cabbage)로부터 포스포리파제 D를 얻는 일반적인 방법은 Yang등에 의해 잘 알려져 있으며-[S.F. Yang, et al., J. Biol. Chem., 242(3), 477-484(1967)] 땅콩(Peanut seeds)이나 목화씨(cotton seeds), 대두(soybean) 등에서도 부분적 혹은 완전 정제하여 본 발명에 사용될 수 있다. 미생물로부터 생산된 포스포리파제 D는 주로 스트렙토마이세스(*Streptomyces*) 속 유래의 효소가 발효로 생산되어 사용될 수 있다. 일반적으로 이들은 식물에서 추출된 것보다 인지질 전환반응 효율이 높아 전환반응에 더 유리하다.

<17> 이 전환효소반응은 통상의 조건에서 실시할 수 있으며, 이 전환효소반응 후에 얻어진 혼합물은 그대로 후속하는 가수분해효소 반응을 시키거나, 혹은 이 혼합물로부터 포스파티딜에탄올아민을 일차적으로 정제하여 이를 사용할 수도 있다.

<18> 본 발명의 방법에 따르면, 인지질 전환효소로 처리되거나 혹은 처리되지 않은 인지질 혼합물을 인지질 가수분해 효소, 예를 들어 포스포리파제 A2로 처리하여 인지질 혼합물 중의 포스파티딜에탄올아민을 리소포스파티딜에탄올아민으로 전환시킴으로써 많은 양의

리소포스파티딜에탄올아민을 얻을 수 있다.

<19> 본 발명에 이용한 인지질 가수분해 효소는 소나 돼지의 췌장에서 추출한 포스포리파제 A2 혹은 포스포리파제 A2 활성을 가진 리파제 또는 프로테아제와 리파제를 불활성화시킨 소나 돼지의 췌장 판크레아틴을 이용하는 것이 가능하다. 또한 미생물로부터 발효에 의해 생산된 포스포리파제 A2도 이용할 수 있다. 포스포리파제 A2는 인지질의 sn-2 위치에 있는 글리세롤과 지방산간의 에스테르결합을 가수분해하는 효소로서 주로 뱀독이나 동물의 췌장에 널리 분포하며 공업적으로는 돼지췌장에서 추출하여 농축한 것이 판매되어 사용되고 있다. 본 발명의 한 구현예에서 사용한 포스포리파제 A2는 돼지췌장에서 추출하여 정제된 것으로서 상업용으로 개발된 Novo Nordisk사의 제품을 사용하였다.

<20> 일반적인 인지질의 효소적 가수분해 반응은 인지질 혹은 인지질 혼합물을 5~100배의 물 혹은 유기용매에 녹이고 여기에 효소를 첨가한 후 일정온도에서 격렬히 교반함에 의해 이루어진다. 효소반응 온도는 실온 내지 70℃ 정도의 온화한 반응조건에서 주로 이루어지나 대개 25~50℃의 온도범위에서 하는 것이 바람직하다.

<21> 또한 효소반응에 유기용매를 사용하는 경우에는 공정 및 작업안전성을 위하여 이들의 비등점 및 인화점을 고려하는 것이 바람직하다. 첨가하는 효소의 양은 종류, 순도, 원료 상태 및 가격 및 기질내 인지질의 함량등을 고려하여 결정된다. 일반적인 효소투여량은 인지질 kg당 10,000~50,000 유닛의 효소를 사용한다 (레시타제, Novo Nordisk사 권장량). 가수분해 반응시간은 첨가된 효소의 양, 반응온도, 인지질의 함량 및 교반속도등에 의해 결정된다. 본 발명에 이용한 효소반응은 효소공급업체에서 추천한 일반적인 반응법을 사용하였다. 다만 일정한 가수분해반응을 위하여 효소의 양과 반응시간을 적절히 조절하였으며 인지질의 가용화를 위하여 유기용매를 첨가하였다.

- <22> 효소반응을 위한 유기용매로서는 디에틸에테르(diethyl ether), 이소프로필에테르(isopropyl ether), 부틸에테르(butyl ether), 노말-헥산(n-hexane), 시클로헥산(cyclohexane), 노말헵탄(n-heptane), 메틸아세테이트(methyl acetate), 에틸 아세테이트(ethyl acetate), 부틸 아세테이트(butyl acetate)등을 들 수 있다.
- <23> 이 반응 후에 잔존하는 물과 유기용매는 필요에 따라 제거하지 않고 그 다음의 유기용매 분획단계에 그대로 이용될 수 있다. 특히, 물의 경우에는, 후속하는 유기용매 분획단계에서 필요하다. 따라서, 후속하는 유기용매 분획단계에서, 물은 별도로 반응계에 첨가되거나 혹은 가수분해효소반응 단계에서 사용되고 잔존하는 것일 수 있다.
- <24> 한편, 위와 같이 효소적 인지질 전환반응을 실시한다고 하더라도 100%의 전환율을 기대하기 어렵고, 부산물로서 포스파티딜산(PA), 리소포스파티딘산 (Lysophosphatidic acid) 등이 생성되는 것을 피할 수 없다. 그리고, 효소반응의 결과 생성된 리소인지질이 계면에서 강한 친수성 성향을 갖기 때문에 리소인지질의 회수가 쉽지 않고 수율이 저하되며, 추출회수시에도 많은 물을 함유함에 의해 농축시 기포를 발생시키기 때문에 농축공정이 어렵다. 이렇게 하여 리소인지질을 생산하더라도 이중에 함유된 리소포스파티딜에탄올아민만을 분리하는 것도 쉬운 공정은 아니다. 왜냐하면 리소인지질의 주요 구성성분인 리소포스파티딜에탄올아민과 리소포스파티딜콜린이 물과 유기용매에 대한 용해성향이 유사하기 때문에 분리가 어렵기 때문이다.
- <25> 본 발명에서는 이 문제점을 해결하고 고순도의 리소포스파티딜에탄올아민을 얻기 위해서, 저급 알콜, 탄화수소, 알킬 에스테르등으로부터 선택된 1개 이상의 유기용매와 물의 혼합물로 상기 LPE-함유 리소인지질 혼합물을 처리하고 결정화함으로서 리소포스파티딜에탄올아민 이외의 불순물(즉 반응 후 생성되는 리소포스파티딜에탄올아민 이외의 인지

질(예를 들면, PC, LPC, PE, PA등)이나 중성지질, 지방산, 콜레스테롤 등)을 제거하여 고순도의 리소포스파티딜에탄올아민을 제조할 수 있다.

<26> 본 발명의 방법에서, 리소포스파티딜에탄올아민 이외의 불순물을 제거하기 위한 용매분획방법에 사용되는 용매는 탄소수 1-4의 저급 알콜(예를들면 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 등); 1개 이상의 탄화수소군(탄소수 6-12의 지방족 탄화수소, 예를들면 펜탄, 헥산, 시클로헥산, 헵탄, 옥탄, 시클로옥탄, 메틸시클로헥산 등); 또는 카르복실산의 알킬에스테르(예를들면, 탄소수 2-6의 것으로서, 메틸 아세테이트, 에틸 아세테이트, 메틸 프로피오네이트, 메틸 부틸레이트, 메틸 카프로에이트 등)에서 선택된 1종 이상의 유기 용매 및 물의 혼합물이다.

<27> 용매분획단계에서 사용되는 용매의 총량은 인지질에 대하여 0.5~20배(무게비)의 범위에
서 선정된다.

<28> 본 발명에서 바람직하게 사용될 수 있는 유기용매는 저급 알콜의 경우에는 메탄올 또는 에탄올이고, 탄화수소의 경우엔 헥산, 시클로헥산 혹은 헵탄이며, 알킬 에스테르의 경우엔 에틸 아세테이트를 들 수 있다.

<29> 물과 유기용매와의 혼합 비율은 0.5~80 : 20~99.5 (부피비)의 범위에 있을 수 있다. 전술한대로, 가수분해효소 반응단계에서 사용된 물이나 유기용매가 잔존하는 경우에, 용매분획단계에서는 별도의 물 혹은 유기용매를 첨가하거나 첨가하지 않음으로써 위의 범위 값을 갖도록 조정할 수 있다. 그리고 2종 이상의 유기용매를 함께 사용하는 경우에는, 그 비율은 특별히 한정되지 않는다. 저급 알콜을 함유하는 유기용매 혼합물을 사용하는 경우, 알콜은 10~99%(부피)의 양으로 함유될 수 있다.

- <30> 유기 용매 및 물의 혼합물을 이용하여 상기 인지질 가수분해 효소반응물을 처리하고 -10℃ 내지 50℃ 정도의 온도범위를 가진 저온에서 결정화한 다음, 원심분리나 여과 혹은 상등액의 제거등의 방법에 의해 리소포스파티딜에탄올아민이외의 불순물을 제거하여 고순도 리소포스파티딜에탄올아민을 정제할 수 있다. 결정화단계는 용매분획 단계 이후에 별도로 온도를 조절하여 행할 수도 있고 혹은 용매분획단계와 동시에 이루어질 수도 있다.
- <31> 본 발명에서 인지질을 용매 분획하는 반응계의 온도는 매우 중요한 인자중의 하나이다. 유기용매 상에서 리소포스파티딜에탄올아민과 리소포스파티딜콜린은 용해도가 온도에 매우 의존적이다. 따라서 선택적인 리소인지질의 분획을 위한 온도는 -10℃ 내지 50℃ 정도의 온화한 조건에서 주로 이루어지나 대개 -10℃ 내지 30℃의 온도범위에서 하는 것이 바람직하며 더욱 바람직하게는 -5℃ 내지 6℃ 내외에서 진행하는 것이 좋다.
- <32> 본 발명에서 반응계의 pH조절 또한 효율적인 분획을 위해서 매우 중요하다. 본 발명을 위한 반응계의 pH는 3-9의 범위에서 진행하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 pH 4-8의 범위에서 수행하는 것이 좋다.
- <33> 유기용매 분획 및 결정화단계에서 형성된 LPE 결정은 통상의 방법, 예를 들어 여과, 원심분리, 혹은 상등액 제거 등의 방법을 통해 회수할 수 있다.
- <34> 위에서 설명한 유기용매 분획/결정화/결정회수의 단계는 1회 실시하여도 무방하지만, LPE의 순도를 높이기 위해, 2회 이상 반복하여 실시할 수도 있다. 이 경우에, 각 단계에서 사용되는 유기용매의 종류 혹은 혼합비율은 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- <35> 본 발명에 의한 리소포스파티딜에탄올아민 생산공정은 연구실, 혹은 산업적 규모에서

고순도 리소포스파티딜에탄올아민 생산에 효율적으로 적용될 수 있으며 큰 부가적인 어려움 없이 고순도의 리소포스파티딜에탄올아민을 얻을 수 있다. 이렇게 얻어진 저렴한 가격의 고순도 리소포스파티딜에탄올아민은 제약이나 농업분야에서 보다 범용적으로 사용될 수 있다.

<36> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시 예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<37> 실시예 1

<38> 정제 난황 인지질 (Doosan Serdary Research Labs.제, 포스파티딜콜린 75%, 포스파티딜에탄올아민 14%, 기타 11%) 80g 을 80 mL의 클로로포름에 녹인다. 실리카겔 (Merck, 70-230 mesh) 450g을 1,000ml의 클로로포름에 넣은 후 70mm x 700mm의 유리컬럼에 충전한다. 이 컬럼에 앞에서 용해한 인지질 용액을 투입한 다음 클로로포름 500ml, 클로로포름: 메탄올 혼합용액(≒95:5) 1000ml, 클로로포름: 메탄올 혼합용액(≒90:10) 1,500ml, 클로로포름: 메탄올 혼합용액(≒85:15) 2,000ml로 용출하면서 박층크로마토그래피로 용출되는 인지질을 조사한다. 포스파티딜에탄올아민이 용출되는 분획만을 모아 회전식 감압농축기(rotary vacuum evaporator)로 50℃에서 농축한다. 이때 얻어진 포스파티딜에탄올아민을 HPLC(Shimazu, Japan)으로 분석한 결과 순도 76%의 포스파티딜에탄올아민 (포스파티딜콜린 11% 함유) 18.5g이 얻어졌음을 알 수 있었다.

<39> 얻어진 순도 76%의 포스파티딜에탄올아민 (포스파티딜콜린 11% 함유) 15g을 150ml의 디에틸 에테르에 녹인 후 여기에 CaCl_2 가 100mM 함유된 초산나트륨 완충액 (pH 5.6, 100mM) 20mL을 첨가한다. 이 용액에 5ml의 레시타제 (10,000 IU/ml, Novo Nordisk사)를

첨가하고 30℃에서 13시간동안 격렬히 저어주면서 반응시킨다. 용액을 정치시킨 후 상징액의 분리(decantation)하여 용매와 생성된 지방산을 제거한다. 침전부분을 상온에서 200mL의 헥산 : 에탄올 : 물 ($\approx 1 : 1 : 0.3$)의 혼합용액으로 추출한다. 아래의 물층을 제거하고 여기에 50ml의 에탄올을 첨가하여 상온에서 여과한다. 여과물에 다시 헥산 : 에탄올($\approx 1:1$) 용액을 100mL처리하여 여과한 다음 건조한다. 이때 만들어진 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 순도 98% 이상의 리소포스파티딜에탄올아민이 4.5g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<40> 실시예 2

<41> 순도 99%의 포스파티딜에탄올아민(Doosan Serdary Research Labs.) 4g을 50ml의 ethylacetate에 녹인 후 여기에 CaCl_2 가 100mM 함유된 초산나트륨 완충액 (pH 5.6, 100mM) 50mL을 첨가한다. 이 용액에 1ml의 레시타제 (Novo Nordisk사)를 첨가하고 30℃에서 6시간동안 격렬히 저어주면서 반응시킨다. 용액을 1시간동안 상온에서 정치시킨 후 상징액의 분리(decantation)하여 용매와 생성된 지방산을 제거한다. 침전부분을 20mL의 헥산 : 에탄올 : 물 ($\approx 1 : 1 : 0.3$)의 혼합용액으로 추출한다. 아래의 물층을 제거하고 여기에 5ml의 에탄올을 첨가하여 -5℃에서 3시간동안 방치 후 여과한다. 여과물에 다시 헥산 : 에탄올($\approx 1:1$) 용액을 15 mL처리하여 여과한 다음 건조한다. 이때 만들어진 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 순도 98% 이상의 리소포스파티딜에탄올아민이 0.85g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<42> 실시예 3

<43> 정제 난황 인지질 DS-PL95E (Doosan Serdary Research Labs.제, 포스파티딜콜린 75%,

포스파티딜에탄올아민 14%, 기타 11%) 100g을 에틸아세테이트(ethyl acetate) 500mL에 용해시켰다. Yang의 방법 [S.F. Yang, et al., J. Biol. Chem., 242(3), 477-484 (1967)]에 의해 만든 양배추 포스포리파제 D 8,000 unit를 80mM의 CaCl_2 과 에탄올아민 25g이 함유된 500ml의 sodium acetate(100mM, pH 5.6) 완충용액과 혼합한 다음 앞에서 용해한 인지질 용액과 혼합하여 실온에서 300rpm에서 교반하면서 13시간동안 반응시켰다. 이것을 HPLC로 분석해 본 결과 반응액내 인지질중의 포스파티딜에탄올아민 함량은 62%였으며 포스파티딜콜린 함량은 22%였다. 반응액중 500mL을을 덜어내어 실시예 4)를 위한 원료로 사용하였다.

<44> 반응 용액 500mL에 10mL의 레시타제 (10,000 IU/mL, Novo Nordisk사)를 첨가하고 30℃에서 6시간동안 격렬히 저어주면서 반응시킨다. 용액을 5시간 동안 정치시킨 후 상정액의 분리(decantation)하여 용매와 생성된 지방산을 제거한다. 남은 반응액을 1,000mL의 헥산 : 에탄올 (≒ 1 : 1, v/v)의 혼합용액으로 상온에서 추출한다. 상등액을 제거하고 남은 액에 200mL의 에탄올을 첨가하여 4℃에서 12시간동안 보관 후 여과하여 침전물을 회수한다. 회수된 고체에 200mL의 헥산: 에탄올: 물(≒ 1: 1: 0.3, v/v/v)을 첨가하여 추출하고 1시간동안 정치한다. 다시 아래의 물 층을 제거하고 에탄올 100mL을 첨가한 후 여과한다. 여과물에 다시 헥산 : 에탄올(≒ 1:1, v/v) 용액을 200mL로 처리하여 다시 4℃에서 8시간동안 보관 후 여과한 다음 건조한다. 이때 만들어진 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 인지질 중의 순도가 99% 이상인 리소포스파티딜에탄올아민이 10.7g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<45> 실시예 4

<46> 실시예 3에서 얻은 용액 500mL에 5ml의 레시타제 (10,000 IU/ml, Novo Nordisk사)를 첨

가하고 30℃에서 10시간동안 격렬히 저어주면서 반응시킨다. 용액을 정치시킨 후 상정액의 분리(decantation)하여 용매와 생성된 지방산을 제거한다. 남은 용액을 1,000mL의 헥산 : 메탄올 (≒ 1 : 1)의 혼합용액으로 추출한다. 상등액인 헥산층을 제거하고 여기에 200mL의 메탄올을 첨가하여 2시간동안 정치한 후 여과한다. 여과 케익에 다시 헥산 : 메탄올: 물(≒ 1: 1: 0.3, v/v/v) 용액을 200mL처리하여 2시간동안 정치 후 여과한 다음 60℃에서 감압 건조한다. 이때 만들어진 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 순도 98% 이상의 리소포스파티딜에탄올아민이 8.5g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<47> 실시에 5

<48> 디팔미토일포스파티딜콜린(Dipalmitoylphosphatidylcholine, Doosan Serdary Research Labs.제, 포스파티딜콜린 99%) 10g을 디에틸 에테르 500mL에 용해시켰다. 스트렙토마이세스속 유래의 포스포리파제 D 500 unit (Sigma 제)를 80mM의 CaCl₂ 과 에탄올아민 6g이 함유된 500ml의 아세트산 나트륨(100mM, pH 5.6) 완충용액과 혼합한 다음 앞에서 용해한 인지질용액과 혼합하여 실온에서 300rpm에서 교반하면서 48시간동안 반응시켰다. 반응액을 HPLC로 분석해 본 결과 반응액내 인지질중의 포스파티딜에탄올아민 함량은 82%였으며 디팔미토일포스파티딜콜린 함량은 16% 였다. 이 용액에 5ml의 레시타제(10,000 IU/ml, Novo Nordisk사)를 첨가하고 30℃에서 10시간동안 격렬히 저어주면서 반응시킨다. 클로로포름/메탄올 혼합용액(2/1, v/v) 300mL을 처리하여 추출하고 하부의 클로로포름층을 회전식 감압농축기(rotary vacuum evaporator)로 50℃에서 농축하여 용매를 제거한 후 8.2g의 농축물을 얻었다. 농축물을 100mL의 헥산 : 에탄올 : (≒ 1 : 1)의 혼합용액으로 가운 하면서 용해하고 여기에 60mL의 물을 첨가한다. 아래의 물층을 제거하고 여기에 50ml의 에탄올을 첨가하여 시료를 -8℃에서 4시간 보관 후 여과한다.

여과물에 다시 헹산 : 에탄올(≒ 1:1) 용액을 100mL처리하여 여과한 다음 건조한다. 이 작업을 2번 반복한다. 이때 만들어진 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 순도 97% 이상의 리소포스파티딜에탄올아민이 3.5g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<49> 실시예 6

<50> 대두 인지질인 포스포리폰 90 (Phospholipon 90G, Natterman Phospholipid GMBH제, 포스파티딜콜린 94%, 리소포스파티딜콜린2%, 기타 4%) 5g을 에테르 100ml에 용해시켰다. 스트렙토마이세스속 포스포리파제 D (Sigma) 40 unit를 40mM의 CaCl_2 과 에탄올아민 2.4g이 함유된 100ml의 sodium acetate(100mM, pH 5.6) 완충용액과 혼합한 다음 앞에서 용해한 인지질 용액과 혼합하여 실온에서 300rpm에서 교반하면서 36시간동안 반응시켰다. 반응액을 HPLC로 분석해 본 결과 반응액내 인지질중의 포스파티딜에탄올아민 함량은 72%였으며 포스파티딜콜린 함량은 18.3%였다.

<51> 이 용액에 2ml의 레시타제(10,000 IU/ml, Novo Nordisk사)를 첨가하고 30℃에서 5시간 동안 격렬히 저어주면서 반응시킨다. 클로포름/메탄을 혼합용액(2/1, v/v) 300mL을 처리하여 추출하고 하부의 클로로포름층을 회전식 감압농축기(rotary vacuum evaporator)로 50℃에서 농축하여 4.5g의 반응물을 얻었다. 반응물을 2회에 걸쳐 80mL의 냉 아세톤(cold acetone)으로 침전시켜 아세톤 불용물을 얻는다. 여기에 50mL의 헹산 : 에탄올 : (≒9 : 1)의 혼합용액으로 가온 하면서 용해하고 여기에 15mL의 물을 첨가한다. 2시간 동안 정치 후 아래의 물 층을 제거하고 여기에 50ml의 에탄올을 첨가하여 시료를 -8℃에서 4시간 보관 후 -8℃에서 여과한다. 여과물에 다시 헹산 : 에탄올(≒1:1) 용액을 100mL처리하여 여과한 다음 건조한다. 이 작업을 2번 반복한다. 이때 만들어진 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 순도 86% 이상의 리소포스파티딜에탄올아민

이 0.9g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<52> 실시예 7

<53> 정제 난황 인지질 DS-PL95E (Doosan Serdary Research Labs. 제, 포스파티딜콜린 75%, 포스파티딜에탄올아민 14%, 기타 11%) 30g을 에틸아세테이트 60mL에 용해시켰다. 스트랩 토마이세스속 유래의 포스포리파제 D 800 unit (Sigma제)를 80mM의 CaCl_2 과 에탄올아민 8g이 함유된 100mL의 아세트산 나트륨(100mM, pH 5.6) 완충용액과 혼합한 다음 앞에서 용해한 인지질 용액과 혼합하여 35℃에서 300rpm에서 교반하면서 13시간동안 반응시켰다. 반응액을 HPLC로 분석해 본 결과 반응액내 인지질중의 포스파티딜에탄올아민 함량은 79%였으며 포스파티딜콜린 함량은 16% 였다.

<54> 이 용액에 3mL의 레시타제 (10,000 IU/mL, -Novo Nordisk사)를 첨가하고 35℃에서 6시간 동안 격렬히 저어주면서 반응시킨다. 반응 용액 중에서 50mL을 뽑아내어 100mL의 무수 에탄올을 처리하고 -2℃에서 30분간 방치한 다음 여과한다. 얻어진 5.7g의 여과물에 50mL의 80% 에탄올을 첨가하여 30분간 300rpm에서 교반한다. 시료를 -2℃에서 4시간 보관 후 여과한 다음 50mL의 80% 에탄올 용액을 이용하여 위조작을 2번 더 진행 후 여과물을 건조한다. 이때 만들어진 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 순도 97% 이상의 리소포스파티딜에탄올아민이 1.5g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<55> 실시예 8

<56> 실시예 7에서 얻어진 반응용액 중 50mL을 뽑아내어 회전식 감압농축기로 40℃에서 감압 농축하여 용매인 에틸아세테이트를 제거한 다음 실시예 7의 조작을 반복하였다. 제조된 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 순도 95% 이상의 리소포스파티딜에

탄올아민이 1.9g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<57> 실시예 9

<58> 실시예 7에서 얻어진 반응용액을 중 50mL을 뽑아내어 250mL의 둥근플라스크에 넣고 회전식 감압농축기(rotary vacuum evaporator)로 40℃에서 감압 농축하여 용매인 에틸아세테이트를 제거한 다음 100mL의 무수 에탄올을 처리하고 -2℃에서 1시간 30분간 방치한 다음 여과한다. 얻어진 8.7g의 여과물에 100mL의 에탄올: 에틸아세테이트: 물 혼합용액 (= 1: 0.5: 0.5, v/v/v)을 처리하여 60℃에서 서서히 교반하면서 30분간 가열한다. 이 액을 여과하여 불순물을 제거하고 여액을 -2℃에서 3시간동안 냉장 보관한다. 결정화된 용액을 여과하여 4.8g의 여과물을 얻는다. 얻어진 여과물에 80mL의 에탄올: 에틸아세테이트: 물 혼합용액 (= 1: 0.5: 0.5, v/v/v)을 처리하여 60℃에서 서서히 교반 하면서 30분간 가열한 다음 -2℃까지 천천히 냉각한 후 여과한다. 여과물을 위 혼합 용액으로 동일하게 2번에 걸쳐 처리한 후 30℃에서 진공 건조한 다음, 제조된 건조물을 액체크로마토그래피에 의해 조사해 본 결과 인지질 순도 97% 이상의 리소포스파티딜에탄올아민이 1.6g 얻어졌음을 알 수 있었다.

<59> 비교예 1

<60> 실시예 7에서 얻어진 반응용액 중 10mL을 뽑아내어 50mL의 클로로포름/메탄올 혼합용액 (≒2/1, v/v)로 추출한다. 상층의 물과 메탄올 층을 제거하고 아래층에 에탄올 (혹은 메탄올)을 10mL씩 첨가한 다음 -5℃에서 1-3시간동안 방치한 다음 시료를 조사한다. 전혀 리소 포스파티딜에탄올아민의 결정이 형성되지 않았으며 하층부에는 반응 생성물인 리소포스파티딜에탄올아민과 리소포스파티딜콜린, 지방산, 포스파티딜콜린, 스펅고미엘

린, 포스파티딘산등이 혼입되어 있었다.

<61> 비교예 2

<62> 실시예 7에서 얻어진 반응용액 중 10mL을 뽑아내어 30mL의 클로로포름으로 추출한다.
2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층의 돌층을 제거하고 하층의 시료를 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)로 조사한다. 전혀 리소 포스파티딜에탄올아민의 결정이 형성되지 않았으며 하층부에는 중성지질과 반응 생성물인 지방산이 대부분이었으며 극소량의 리소포스파티딜콜린, 스펡고미엘린등이 혼입되어 있었다.

<63> 비교예 3

<64> 실시예 7에서 얻어진 반응용액 중 10mL을 뽑아내어 30mL의 에틸 아세테이트(혹은 헥산)으로 추출한다. 2,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상층의 시료를 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)로 조사한다. 전혀 리소 포스파티딜에탄올아민의 결정이 형성되지 않았으며 상층부에는 중성지질과 반응 생성물인 지방산이 대부분이었으며 극소량의 리소포스파티딜콜린, 스펡고미엘린등이 혼입되어 있었다.

【발명의 효과】

<65> 본 발명은 인지질 혼합물을 효소 처리하여 고농도의 포스파티딜에탄올아민을 함유하는 인지질을 제조한 후 인지질 가수분해 효소처리를 통해 고농도의 리소 포스파티딜에탄올아민이 함유된 리소 인지질 혼합물을 만들고 용매를 이용하여 칼럼 정제법을 거치지 않고 추출 정제함으로서 고순도의 리소포스파티딜에탄올아민을 값싸게 정제할 수 있는 공정에 관한 것이다. 이렇게 제조된 고순도의 값싼 리소 포스파티딜에탄올아민은 식품, 의약품, 화장품 및 농업용으로 사용될 수 있다.

1019990053780

2000/6/3

【특허청구범위】**【청구항 1】**

다음 단계:

(1) 포스파티딜에탄올아민을 함유하는 인지질 혼합물을 인지질 가수분해효소로 처리하여 혼합물 중의 포스파티딜에탄올아민을 리소포스파티딜에탄올아민으로 전환시켜 리소인지질(lysophospholipid) 혼합물을 얻는 단계;

(2) 상기 단계 (1)에서 얻어진 리소인지질 혼합물을 저급 알콜; 탄화수소; 및 알킬 에스테르로 이루어진 군에서 선택된 1종 혹은 2종 이상의 유기용매 및 물과의 혼합용매로 추출하는 용매분획단계;

(3) 상기 단계 (2)에서 얻은 반응혼합물을 -10~50℃의 온도에서 정치시켜 리소포스파티딜에탄올아민 결정을 침전시키는 단계; 및

(4) 상기 단계 (3)에서 생성된 침전을 회수하는 단계를 포함함을 특징으로 하는 고순도 리소포스파티딜에탄올아민의 제조방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 인지질 혼합물은 포스파티딜에탄올아민을 10~99중량%의 양으로 함유함을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 인지질 혼합물은 포스파티딜에탄올아민을 30~99중량%의 양으로 함유함을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 인지질 혼합물은 대두 인지질 혹은 난황 인지질임을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 인지질 혼합물은 에탄올아민의 첨가하에 인지질 전환 효소로 처리되어 혼합물중의 포스파티딜콜린을 포스파티딜에탄올아민으로 전환된 것임을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 인지질 가수분해효소는 포스포리파제 A2임을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 단계 (2)의 유기용매는 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜; 탄소수 6 내지 12의 직쇄 또는 분지쇄의 지방족 혹은 방향족 탄화수소; 및 탄소수 2 내지 6의 직쇄 또는 분지쇄 지방산과 탄소수 1 내지 8의 직쇄 또는 분지쇄 알킬기와의 에스테르로 이루어진 군에서 선택된 2종 이상 혼합물임을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 알콜은 메탄올 또는 에탄올이고, 상기 탄화수소는 헥산, 시클로헥산 또는 헵탄이며, 상기 알킬 에스테르는 에틸 아세테이트 임을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 9】

제1항에 있어서, 상기 단계 (2)와 단계 (3)은 동시에 진행됨을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 10】

제1항에 있어서, 상기 단계 (3)의 결정화는 $-10\sim 30^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 행함을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 11】

제1항, 7항 또는 8항에 있어서, 상기 단계 (2)의 혼합용매는 물과 유기용매의 비율이 0.5~80 : 20~99.5 부피%임을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 12】

제1항에 있어서, 상기 단계(2)의 혼합용매는 물과 알코올의 혼합물질을 특징으로 하는 제조방법.

【서류명】	서지사항보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2000.01.21
【제출인】	
【명칭】	주식회사 두산
【출원인코드】	119980009236
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	윤동열
【대리인코드】	919980003073
【대리인】	
【성명】	이선희
【대리인코드】	919980004344
【사건의 표시】	
【출원번호】	1019990053780
【출원일자】	1999.11.30
【심사청구일자】	1999.11.30
【발명의 명칭】	리소포스파티딜에탄올아민의 제조방법
【제출원인】	
【발송번호】	151999004054917
【발송일자】	1999.12.21
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상 항목】	첨부서류
【보정방법】	제출
【보정내용】	
【첨부서류】	위임장
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제12조의 규정에 의하여 위와 같이 제출합니다.
【수수료】	
【보정료】	11000
【기타 수수료】	0
【합계】	11000
【첨부서류】	위임장 1통

